รายงานผลการวิจัย

ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

เรื่อง

การสร้างภูมิคุ้มกันต่อพิษงูเห่าในแกะโดยการกระตุ้นของพิษงูที่อยู่ในรูปโพลิเมอร์

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ กาญจนา จันทองจีน
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุจินต์ ชลายนคุปต์

จท
จท 15
001446

2522

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
21 ส.ค. 2526

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การสร้างภูมิคุ้มกันต่อพิษงูเห่าในแกะโดยการกระตุ้นของพิษงูที่อยู่ในรูปโพลิเมอร์

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ กาญจนา จันทองจีน

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุจินต์ ชลายนคุปต์

กันยายน ๒๕๒๒

ฝ่ายวิจัย สำนักงานอธิการบดี จุฬาฯ
รับมอบจากศูนย์กลางจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
25 / ส.ค. / 25

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

016111

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. นรว. พุฒิพงศ์ วรวุฒิ หัวหน้าภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ใช้สถานที่เลี้ยงสัตว์ทดลอง และให้ความสดวกในการใช้ เครื่องปั่นแยกสาร และขอขอบพระคุณ แพทย์หญิง คุณหญิง ศรีประไพ ผ่องอักษร ผู้อำนวยการสถานเสาวภาที่กรุณาให้คำปรึกษาและข้อมูลต่าง ๆ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากคณะผู้วิจัยได้รับเงินอุดหนุนค่าใช้จ่ายจากเงินทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช คณะผู้วิจัยจึงขอขอบคุณไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

ชื่อโครงการวิจัย การสร้างภูมิคุ้มกันต่อพิษงูเห่าในแกะโดยการกระตุ้นของพิษงูเห่าที่อยู่ในรูปโพลิเมอร์

ชื่อผู้วิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ กาญจนา จันทองจีน
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สุจินต์ ชลายนคุปต์

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ กันยายน ๒๕๒๒

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะหาวิธีการผลิตสารต่อต้านพิษงูเห่าไทย (Naja naja siamensis) ที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าที่มีใช้อยู่ในปัจจุบันโดยวิธีการง่าย ๆ สารต่อต้านพิษงูเห่าที่ผลิตได้ในปัจจุบันยังมีประสิทธิภาพไม่ดีเท่าที่ควร ปัญหาของการผลิตเกิดจากสาเหตุ ๓ ประการ คือ พิษงูเห่าเป็นสารที่มีพิษสูงมาก ดังนั้นจึงไม่สามารถฉีดเข้าไปมากพอที่จะกระตุ้นให้สัตว์สร้างสารต่อต้านพิษงูเห่าในระดับสูงได้ ประการที่ ๒ คือ พิษงูเห่ามีขนาดโมเลกุลเล็กจึงขาดคุณสมบัติของการเป็นแอนติเจนที่ดี และประการสุดท้ายคือ พิษงูเห่าที่รีดมาจากตัวงูนั้น มีสารโปรตีนชนิดอื่น ๆ ที่ไม่ใช่พิษงูปะปนอยู่มาก

งานวิจัยที่รายงานนี้คณะผู้วิจัยได้แก้ปัญหาทั้ง ๓ ข้อดังกล่าวข้างต้น โดยแยกโปรตีนส่วนที่ไม่ใช่สารพิษออกได้ ๓๔% ของโปรตีนในพิษงูทั้งหมดด้วยการแช่สารละลายของพิษงูที่อยู่ในสภาพเป็นกรด (pH 5.8) ในอ่างน้ำร้อน ๔๐° เซลเซียสเป็นเวลา ๒๐ นาที แล้วแยกเอาโปรตีนที่ตกตะกอนออก ต่อจากนั้นจึงทำลายความเป็นพิษและเพิ่มขนาดของโมเลกุลโดยการทำให้อยู่ในรูปโพลิเมอร์ด้วยสาร glutaraldehyde

โพลิเมอร์ของพิษงูเห่าที่ได้นำไปใช้เป็นแอนติเจนในการกระตุ้นให้แกะสร้างสารต่อต้านพิษงูเห่า (anti-toxin) โดยใช้ปริมาณต่าง ๆ กัน ผลการทดลองพบว่า แกะกลุ่มที่ได้รับแอนติเจนขนาด ๔ มิลลิกรัมต่อน้ำหนัก ๑ กิโลกรัมสามารถสร้างสารต่อต้านพิษงูได้สูงถึง ๑๔๔.๖๔ $L D_{50}$ หลังจากที่ได้รับการฉีดแอนติเจน ๒๐ ครั้ง ระดับของสารต่อต้านพิษงูที่ได้ในแกะกลุ่มนี้สูงเป็น ๓ เท่าของที่ผลิตได้ในปัจจุบัน

Project Title Immune Response to Polymerized Cobra Venom in Sheep

Name of the Investigators Assistant Prof. Dr. Naline Nilubol

Assistant Prof. Kanchana Juntongjin

Assistant Prof. Suchin Jalayanakupta

Year 1979

Abstract

The purpose of this study is to produce higher quality anti-toxin of Thai cobra (Naja naja siamensis) venom, since the present used anti-toxin is still unsatisfactory. In order to do so, three problems must be solved.

(a) to reduce the toxicity of toxin

(b) to increase the molecular size of the toxin

(c) to eliminate nontoxic protein from cobra venom.

It was found in our study that 35 % of nontoxic proteins could be removed by heating the cobra venom suspension of pH 5.8 at 80° C for 20 minutes. The partially purified toxin was detoxified and increased molecular size by polymerization with glutaradehyde. The polymer of toxin was used as antigen to immunize sheep. It was observed in a group of 3 sheep who received 4 mg. of the polymer per 1 kg. of the body weight that the serum titer of the anti-toxin as high as 154.64 LD_{50} could be induced after the administration of the 20th dose of antigen. The titer of anti-toxin produced in this experiment is about 3 times higher than those presently use in Thailand.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	II
บทคัดย่อภาษาไทย	III
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	IV
รายการตารางประกอบ	VI
รายการภาพประกอบ	VI
บทนำ	๑
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	๑
วิธีการวิจัย	๔
ผลของการวิจัย	๘
การอภิปรายผล	๑๖
ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ	๒๐
บรรณานุกรม อ้างอิง	๒๑

เลขหมู่ จฬ
จก 15
เลขทะเบียน 001446
วัน,เดือน,ปี 21 มีค. 26

รายการตารางประกอบ

		หน้า
ตารางที่ ๑	ระดับของสารต่อต้านพิษงู (anti-toxin antibody)	๑๓-๑๖

รายการภาพประกอบ

รูปที่ ๑	แสดงการเตรียมโพลิเมอร์พิษงู (แอนติเจน) โดยย่อ	๕
รูปที่ ๒	แสดงระดับของสารต่อต้านพิษงูในแกะกลุ่มที่ ๓	๑๔
รูปที่ ๓	เปรียบเทียบระดับของสารต่อต้านพิษงูในแกะกลุ่มที่ ๑,๒,๓,๔ โดยใช้ค่า LD_{50} ที่ซีรั่ม ๑ มล. ทำลายได้	๑๕

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

การผลิตเซรุ่มแก้พิษงูในปัจจุบันมีปัญหาที่สำคัญ ๒ ประการ คือ ปริมาณที่ผลิตออกมาไม่เพียงพอแก่ความต้องการและประสิทธิภาพของซีรั่มที่ผลิตขึ้นไม่ดีเท่าที่ควร เนื่องจากระดับของสารแก้พิษงู (antibody) ที่มีอยู่ในซีรั่มค่อนข้างต่ำ

ปัญหาเหล่านี้มีสาเหตุ ๓ ประการ คือ

๑. พิษงูเป็นสารที่มีความเป็นพิษ (toxicity) สูง ดังนั้นการฉีดเข้าสัตว์เพื่อกระตุ้นให้สัตว์สร้างสารแก้พิษงู หรือแอนติบอดี้เพื่อจะนำซีรั่มนั้นมาใช้แก้พิษงูจึงต้องใช้พิษงูปริมาณต่ำมาก ซึ่งอาจจะต่ำกว่าปริมาณที่เหมาะสม (optimal dose) ทำให้การสร้างแอนติบอดี้ในสัตว์เกิดขึ้นได้น้อยและต้องใช้เวลานานในการกระตุ้น

๒. สารพิษ (neurotoxin) ที่อยู่ในพิษงู มีโมเลกุลขนาดเล็กทำให้ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดแอนติบอดี้ได้ในระดับสูง

๓. พิษงูเห่าที่รีดมาจากตัวงูนั้นมีโปรตีนที่ไม่ใช่สารพิษปะปนอยู่มาก ดังนั้นการวิจัยต่อไปนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะผลิตแอนติบอดี้ให้ได้ปริมาณมาก และมีประสิทธิภาพสูงขึ้น โดยการลดปริมาณโปรตีนที่ไม่ใช่สารพิษลง เปลี่ยนแปลงโมเลกุลของพิษงูเห่าให้ความเป็นพิษลดลง และให้มีขนาดใหญ่ขึ้น คือ อยู่ในรูปของโพลิเมอร์แล้วใช้โพลิเมอร์เป็นแอนติเจนไปฉีดในแกะทดลอง หาปริมาณของแอนติเจนที่เหมาะสม และระยะเวลาที่สัตว์สร้างแอนติบอดี้ได้สูงสุดหลังจากได้รับแอนติเจน

การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Yang et al. (1967) ได้เปลี่ยนแปลงโมเลกุลของพิษงูเห่าตรงส่วนของ free amino groupsโดยวิธีการ fluorescein thiocarbamylation พิษงูเห่าที่ได้ใหม่นั้นจะสูญเสียความเป็นพิษ แต่ยังให้ปฏิกริยากับแอนติบอดี้ต่อพิษงูได้เหมือนเดิม

Chang et al (1971) ได้เปลี่ยนแปลงพิษงูเห่าโดยเปลี่ยนตรงโมเลกุลของ tyrosine ตำแหน่งที่ ๓๙ ด้วยสาร tetranitromethan แต่วิธีนี้ใช้ไม่ได้เพราะพิษงูที่เปลี่ยนแล้วยังคงมีพิษอยู่ ต่อมา Chang ได้เปลี่ยน tyrosine ตำแหน่งที่ ๒๕ โดยใช้

สาร 5 M guanidine-HCl และพบว่าความเป็นพิษหมดไปแต่พิษงูที่เปลี่ยนไปแล้วไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันได้ นอกจากนี้ Chang ยังได้เปลี่ยนแปลงพิษงูโดยเปลี่ยนตรง free carboxyl group ด้วยวิธี glycine-methyl-ester หลังจาก activate ด้วย water soluble carbodiimide แต่พบว่าวิธีนี้ใช้ไม่ได้เพราะพิษงูที่ได้ถึงแม้จะมีพิษลดลง แต่ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันได้

Karlsson and Eaker (1972) ได้ทำให้พิษงูเห่า N. naja siamensis อยู่ในรูปโพลิเมอร์ โดยใช้สาร 2-hydroxy -5-nitrobenzyl bromide (HNB-bromide) พบว่าโพลิเมอร์ที่ได้มีพิษน้อยลง และสามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันได้

Huang et al (1972) ได้เปลี่ยนแปลงโมเลกุลของพิษงูเห่า N. naja atra โดยเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของ histidine ตำแหน่งที่ 32 ด้วยวิธี photooxidation วิธีนี้ใช้ไม่ได้ เพราะถึงแม้ว่าจะเป็นวิธีที่ทำให้พิษงูเห่าหมดไปก็ตาม แต่พิษงูเห่าที่ได้รับการเปลี่ยนแล้วไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันได้

Yang et al (1973) ได้เปลี่ยนโมเลกุลของพิษงูเห่าโดยเปลี่ยนตรงโมเลกุลของ arginine ด้วยสาร phenylglyoxal ที่ pH 8 อุณหภูมิ 27°ซ พบว่าพิษงูที่เปลี่ยนแปลงแล้วไม่มีพิษ แต่ใช้กระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันไม่ได้

นอกจากนี้ จากผลงานวิจัยซึ่งเป็นวิทยานิพนธ์เพื่อเสนอขอรับปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ปีการศึกษา ๒๕๒๐ของน.ส.กาญจนา ศีระสมบูรณ์ เรื่อง"การทำลายพิษงูเห่าโดยการทำให้อยู่ในรูปของโพลิเมอร์และคุณสมบัติของการเป็นแอนติเจนของโพลิเมอร์ในหนู" พบว่า

ก. โมเลกุลของพิษงูเห่าสามารถทำให้อยู่ในรูปโพลิเมอร์ได้โดยใช้สารglutaraldehyde

ข. โพลิเมอร์ที่ได้จากพิษงูจะมีความเป็นพิษลดลงมาก

ค. โพลิเมอร์ของพิษงูเห่าสามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันต่อพิษงูในหนู(Wistar Strain Rat) ได้

งานวิจัยนี้ได้ทำต่อเนื่องจากงานวิจัยเรื่องที่กล่าวมาแล้วนี้ โดยใช้แกะเป็นสัตว์ทดลองแทนหนูซึ่งมีขนาดเล็ก การใช้แกะจะทำให้ได้ซีรั่มที่มีแอนติบอดี้ต่อพิษงูปริมาณมาก ผลการวิจัยนี้จะเป็นทางนำไปสู่สัตว์ทดลองที่มีขนาดใหญ่ขึ้น เช่น ม้า ซึ่งซีรั่มม้านี้ใช้ทำซีรั่มแก้พิษงูที่ผลิตออกมาแก้คนที่ถูกงูกัด

วิธีการวิจัย

๑. เตรียมสัตว์ทดลอง

ก. คัดเลือกแกะจำนวน ๑๒ ตัว จากไร่ฝึกนิสิตคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดนครปฐม แกะที่คัดเลือกทั้งหมดเป็นเพศผู้ (ตอน) มีน้ำหนักตัวอยู่ระหว่าง ๑๙- ๒๕ กิโลกรัม

ข. เจาะเบอร์ที่หูแกะทุกตัว

ค. ถ่ายพยาธิ์

ง. เลี้ยงแยกจากแกะตัวอื่น ๆ และเริ่มบำรุงโดยให้อาหารผสม

๒. เตรียมแอนติเจนจากพิษงูเห่า

ก. ใช้พิษงูเห่าแห้ง (lyophilized cobra venom) จากสถานเสาวภา สภากาชาดไทย เป็นพิษจากงูเห่า Naja naja siamensis

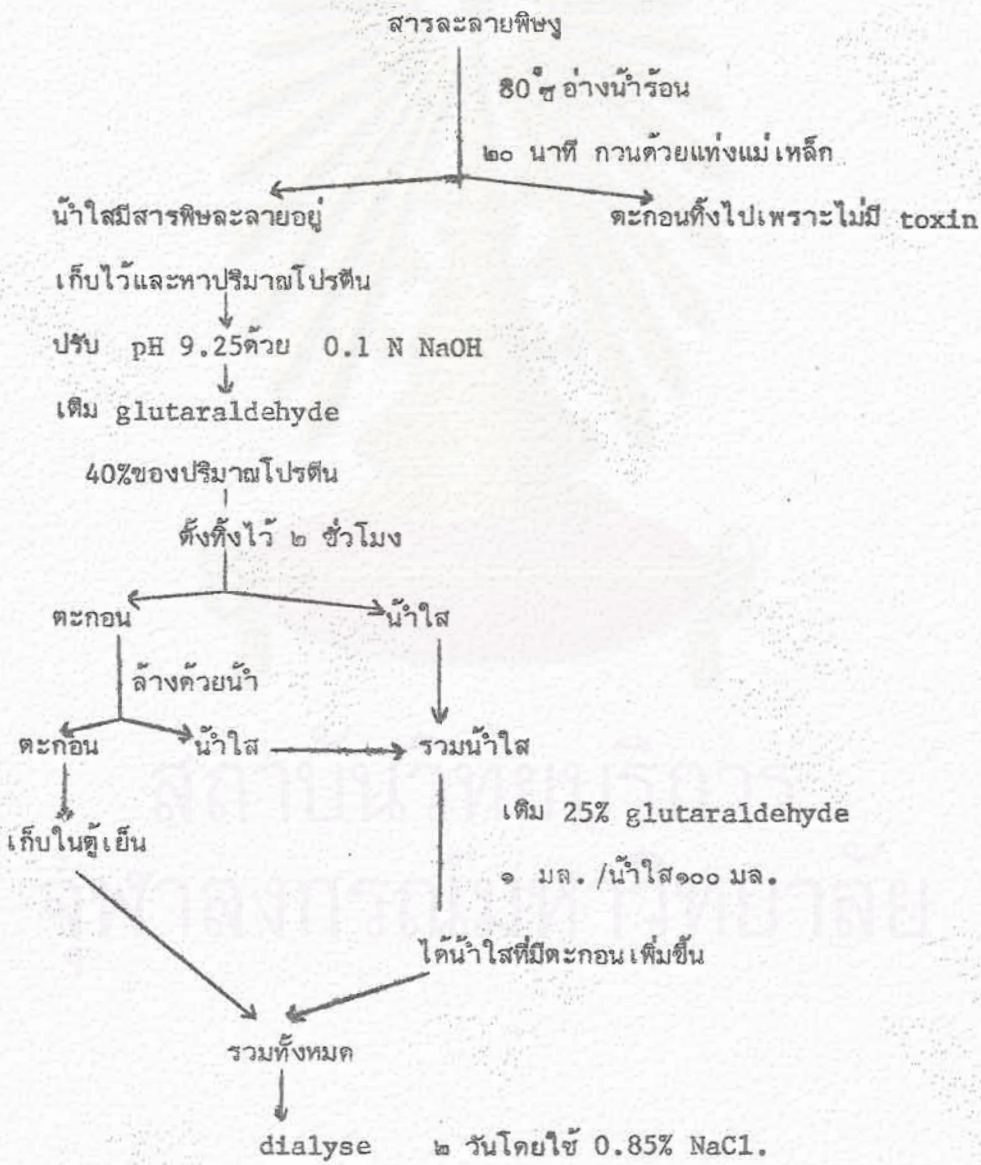
ข. นำพิษงูเห่าทั้งหมดมาบดรวมกันเพื่อใช้ตลอดการทดลอง โดยเก็บพิษงูไว้ในที่เย็นและมีความชื้นต่ำ แล้วแบ่งออกมาใช้ทดลองทีละ ๑๐ กรัม

ค. ชั่งพิษงู ๑๐ กรัม ละลายด้วย 0.05 M acetate buffer pH 5.8 ที่เติม 0.9 % NaCl. โดยให้สารละลายพิษงูมีความเข้มข้น 2.5 % (10 กรัมใน buffer 400 มิลลิลิตร)

ง. แบ่งสารละลายพิษงูเป็น ๓ ส่วน แล้วแยกโปรตีนบางส่วนที่ไม่ใช่พิษงูออกโดยนำแต่ละส่วนไปแช่ในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 80°ซ เป็นเวลา ๒๐ นาที โดยใช้แท่งแม่เหล็กกวนตลอดเวลา วิธีนี้จะทำให้โปรตีนบางส่วนที่ไม่ใช่พิษงูตกตะกอน แล้วนำไป centrifuge เพื่อแยกตะกอนออก

จ. ส่วนน้ำใส ๆ ที่ได้จาก centrifuge จะยังคงเป็นส่วนที่มีสารละลายพิษงูอยู่ นำส่วนน้ำใสนี้มาหาปริมาณโปรตีน โดยใช้วิธีของ Lowry (1951) แล้วนำไป polymerize ด้วย glutaraldehyde (2.5 % solution) โดยใช้ปริมาณ 40 % ของน้ำหนักโปรตีนที่นำมาทำโพลิเมอร์ด้วยวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีการเชื่อมโมเลกุลของโปรตีนของ Avrameas et al (1969) วิธีการอย่างละเอียดแสดงไว้ในรูปที่ ๑

รูปที่ ๑ แสดงการเตรียมโพลิเมอร์พิษงู(แอนติเจน) โดยย่อ



ฉ. โพลิเมอร์ที่เกิดขึ้นจะอยู่ในรูปของตะกอนสีส้ม เมื่อตั้งทิ้งไว้จะแยกตัวออกจากส่วนน้ำใส แยกตะกอนออกแล้วเก็บไว้ในตู้เย็นส่วนน้ำใสจะยังคงมีความเป็นพิษเหลืออยู่บ้าง เนื่องจากนำไปฉีดเข้าในหนูขาว (Swiss mice) แล้วปรากฏว่าหนูตาย ดังนั้นจึงเติม 2.5%glutaraldehyde ลงไป ๑ มล. ต่อน้ำใส ๑๐๐ มล. แล้วตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องประมาณ ๑๒ ชั่วโมง ต่อจากนั้นจึงรวมตะกอนครั้งแรกและส่วนน้ำใสและตะกอนที่เกิดขึ้นทีหลังเข้าด้วยกัน

ช. นำแอนติเจนที่ได้ในข้อ ฉ. ไป dialyse ๒ วัน ในน้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 0.85 % จำนวน ๑๐ ลิตร แล้วจึงนำตะกอนจากถุง dialyseไปทำให้แตกออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดผ่านเข็มฉีดยาเบอร์ ๒๐ แล้วนำไปใช้เป็นแอนติเจนฉีดแกะต่อไป ตามปริมาณที่เหมาะสม

๓. <u>การฉีดแอนติเจนเพื่อกระตุ้นให้สัตว์สร้างแอนติบอดี้ (Immunization)</u>

ก. แบ่งแกะที่เตรียมไว้ในข้อ ๒.๑ ออกเป็น ๔ กลุ่ม ๆ ละ ๓ ตัว

ข. เจาะเลือดแกะทุกตัวโดยรวมเลือดเป็นกลุ่ม ๆ

ค. ฉีดแอนติเจนที่เตรียมได้ในข้อ ๒ ทางใต้ผิวหนัง โดยให้ dose ต่าง ๆ กันดังนี้

กลุ่มที่ ๑ ให้แอนติเจน ๑ มก. ต่อน้ำหนักแกะ ๑ กก.

กลุ่มที่ ๒ ให้แอนติเจน ๒ มก. ต่อน้ำหนักแกะ ๑ กก.

กลุ่มที่ ๓ ให้แอนติเจน ๔ มก. ต่อน้ำหนักแกะ ๑ กก.

กลุ่มที่ ๔ ให้แอนติเจน ๖ มก. ต่อน้ำหนักแกะ ๑ กก.

ง. ฉีดแอนติเจนด้วย dose ดังกล่าวในข้อ ค. ซ้ำทุก ๗-๑๐ วัน และเจาะเลือดเพื่อหาระดับสารต่อต้านพิษ (anti-toxin)หรือ neutralizing antibody ทุกครั้งก่อนที่จะฉีดแอนติเจน

๔. <u>การหาระดับของสารต่อต้านพิษในซีรั่ม</u>

ระดับของสารต่อต้านพิษได้หาโดยการทำ neutralization test โดยใช้วิธีของ Reed and Muench (1938) เพื่อทดสอบว่าซีรั่มที่ได้จากแกะหลังจากได้ฉีดแอนติเจนแต่ละครั้งจะมีระดับของสารต่อต้านพิษ (anti-toxin)สูงเพียงใด โดยใช้หนูขาว (Swiss mice) น้ำหนักประมาณ ๓๒ กรัม เป็นสัตว์ทดลองและดำเนินการทดลองดังนี้

ก. แยกซีรั่มออกจากเลือดแกะ

ข. ใช้ซีรั่ม ๑ มล. รวมกับพิษงูเห่า 8 LD 50 ในปริมาตร ๑ มล. นำไปแช่ในอ่างน้ำร้อน 37° เป็นเวลา ๑ ชั่วโมง แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ๓๐ นาที จึงนำไปฉีดเข้าช่องท้องหนูขาว ๓ ตัว ๆ ละ ๐.๕ มล. แล้วดูผลหลัง ๒๔ ชั่วโมง โดยนับจำนวนหนูที่อยู่รอด

ค. ถ้าการทดลองที่ได้ในข้อ ข. ปรากฏว่าซีรั่มใดหนูอยู่รอดหมด ๓ ตัว ก็จะนำซีรั่มนั้นมาทำให้เจือจางอีกเท่าตัว (2-fold dilution) แล้วเติมพิษงู 8 LD_{50} แล้วดำเนินการตรวจสอบหาระดับของสารต่อต้านพิษงูตามข้อ ข.

ง. นำค่าที่ได้จากข้อ ข. และ ค. (จำนวนหนูที่อยู่รอด) มาคำนวณหาว่าซีรั่ม ๑ มล. จะทำลายความเป็นพิษของพิษงูได้กี่ LD_{50}

ผลการทดลอง

โพลีเมอร์ของพิษงูซึ่งเตรียมได้จากวิธีในข้อ ๒ เมื่อนำไปฉีดในแกะทดลอง ๔ กลุ่ม ในปริมาณที่ต่าง ๆ กัน แล้วเจาะเลือดแกะแต่ละกลุ่มมาตรวจหาระดับของสารต่อต้านพิษงู (anti-toxin) โดยใช้วิธี Neutralization

กลุ่มที่ ๑ ฉีดแอนติเจน ๑ มก. ต่อแกะหนัก ๑ กก. โดยฉีดรวมทั้งหมดเป็นจำนวน ๑๓ ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน ๗-๑๐ วัน ระดับของสารต่อต้านพิษงู (anti-toxin) ได้เริ่มตรวจพบหลังจากฉีดแอนติเจนครั้งที่ ๗ แต่ระดับสารต่อต้านพิษที่พบต่ำมาก (ดังแสดงในตารางที่ ๑) และเมื่อฉีดแอนติเจนต่อไปอีก ระดับของสารต่อต้านพิษก็ไม่เปลี่ยนแปลง ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้หยุดการทดลองในกลุ่มนี้ หลังจากฉีดแอนติเจนครั้งที่ ๑๓ เนื่องจากเมื่อเทียบกับสัตว์ทดลองกลุ่มที่ ๒, ๓ และ ๔ แล้ว ก็คาดว่าปริมาณของแอนติเจนอาจจะต่ำเกินไปที่จะกระตุ้นให้แกะสร้างสารต่อต้านพิษงู

กลุ่มที่ ๒ ให้แอนติเจน ๒ มก. ต่อแกะหนัก ๑ กก. หลังจากให้แอนติเจนไปแล้ว ๘ ครั้ง จึงเริ่มตรวจพบระดับของสารต่อต้านพิษงู แต่ระดับยังต่ำมาก (ดังแสดงในตารางที่ ๑) และเมื่อฉีดต่อไปจนถึงครั้งที่ ๑๑ ระดับของสารต่อต้านพิษงูก็ยังคงเดิม และหลังจากฉีดแอนติเจนครั้งที่ ๑๒ ปรากฏว่าระดับของสารต่อต้านพิษงูลดลงจนตรวจไม่ได้เลย จึงหยุดการทดลองหลังจากฉีดแอนติเจนครั้งที่ ๑๒ นี้ เพราะคาดว่าปริมาณของแอนติเจนที่ฉีดเข้าไปอาจไม่เหมาะสม ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม ๓ คือเข้าใจว่าปริมาณของแอนติเจนที่ให้อาจจะต่ำเกินไป

กลุ่มที่ ๓ ให้แอนติเจน ๔ มก. ต่อแกะหนัก ๑ กก. หลังจากให้แอนติเจนครั้งที่ ๓ ก็สามารถตรวจพบระดับของสารต่อต้านพิษงูและต่อจากนั้นหลัง dose ที่ 5 ระดับของสารต่อต้านพิษงูได้สูงขึ้นโดยที่ซีรั่ม ๑ มล. สามารถทำลายพิษงูได้ 9.50 LD_{50} และต่อจากนั้นระดับสารต่อต้านพิษงูก็สูงขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่งหลังจากฉีดแอนติเจนแล้ว ๒๐ ครั้ง ระดับของสารต่อต้านพิษงูขึ้นสูงมาก คือ ซีรั่ม ๑ มล. สามารถทำลายพิษงูได้ถึง 150.64 LD_{50} ดังแสดงในตารางที่ ๑

ต่อจากนั้นได้หยุดฉีดแอนติเจน เพื่อที่จะดูว่าระดับของสารต่อต้านพิษงูที่สูงขึ้นจะยังคงอยู่ได้นานเท่าไร พบว่าหลังจากหยุดให้แอนติเจนแล้ว ๒ สัปดาห์ระดับของสารต่อต้านพิษงูลดลง คือ ซีรั่ม ๑ มล. สามารถทำลายพิษงูได้ 26.76 LD_{50} และยังคงอยู่ในระดับนี้ต่อไปได้นานถึง ๒ เดือน หลังจากฉีดแอนติเจนครั้งที่ ๒๐ (ครั้งสุดท้าย) ระดับของสารต่อต้านพิษงูที่ตรวจพบในซีรั่มของแกะกลุ่มที่ ๓ ได้แสดงไว้ในรูปที่ ๒

กลุ่มที่ ๔ ให้แอนติเจน ๖ มก. ต่อแกะหนัก ๑ กก. พบว่าระดับของสารต่อต้านพิษงูเริ่มขึ้นหลังจากให้แอนติเจนครั้งที่ ๕ แต่ระดับสารต่อต้านพิษงูต่ำมากจนไม่สามารถคำนวนได้ ในบางครั้งของการทดลองก็ตรวจไม่พบสารต่อต้านพิษงู (ดังแสดงในตารางที่ ๑) ดังนั้นจึงได้หยุดการทดลองหลังจากฉีดแอนติเจนครั้งที่ ๑๓ โดยคาดว่าปริมาณของแอนติเจนที่ฉีดเข้าไปมากเกินไป

จะเห็นได้ว่าจากระดับของสารต่อต้านพิษงูในแกะทั้ง ๔ กลุ่มดังที่กล่าวมาแล้ว แกะกลุ่มที่ ๓ เป็นกลุ่มที่ได้รับแอนติเจนในขนาดที่เหมาะสมที่สุด จึงทำให้ระดับของสารต่อต้านพิษงูสูงถึง 150.64 LD_{50} การเปรียบเทียบระดับสารต่อต้านพิษงูในแกะทั้ง ๔ กลุ่ม ได้แสดงไว้ในรูปที่ ๓

016111

ตารางที่ ๑ ระดับของสารต่อต้านพิษ (anti-toxin antibody)

เจาะเลือดครั้งที่	ปริมาณที่ฉีดหนู ๑ ตัว		แกะทดลองกลุ่มที่ ๑		แกะทดลองกลุ่มที่ ๒		แกะทดลองกลุ่มที่ ๓		แกะทดลองกลุ่มที่ ๔	
	ซีรั่มแกะ (มล.)	พิษงูเห่า	จำนวนหนูรอด / จำนวนหนูที่ฉีด	ซีรั่ม ๑ มล. ทำลายพิษงูได้	จำนวนหนูรอด / จำนวนหนูที่ฉีด	ซีรั่ม ๑ มล. ทำลายพิษงูได้	จำนวนหนูรอด / จำนวนหนูที่ฉีด	ซีรั่ม ๑ มล. ทำลายพิษงูได้	จำนวนหนูรอด / จำนวนหนูที่ฉีด	ซีรั่ม ๑ มล. ทำลายพิษงูได้
1	0.25	2 LD 50	$\frac{0}{3}$	0 LD 50	$\frac{0}{3}$	0 LD 50	$\frac{0}{3}$	0 LD 50	$\frac{0}{3}$	0 LD 50
2	0.25	2 LD 50	$\frac{0}{3}$	0 LD 50	$\frac{0}{3}$	0 LD 50	$\frac{1}{3}$	น้อยมากคำนวณไม่ได้	$\frac{0}{3}$	0 LD 50
3	0.25	2 LD 50	$\frac{0}{3}$	0 LD 50	$\frac{0}{3}$	0 LD 50	$\frac{1}{3}$	น้อยมากคำนวณไม่ได้	$\frac{0}{3}$	0 LD 50
4	0.25	2 LD 50	$\frac{0}{3}$	0 LD 50	$\frac{0}{3}$	0 LD 50	$\frac{2}{3}$	9.50 LD 50	$\frac{1}{3}$	น้อยมากคำนวณไม่ได้
5	0.25	2 LD 50	$\frac{0}{3}$	0 LD 50	$\frac{0}{3}$	0 LD 50	$\frac{1}{3}$	น้อยมากคำนวณไม่ได้	$\frac{0}{3}$	0 LD 50
6	0.25	2 LD 50	$\frac{1}{3}$	น้อยมากคำนวณไม่ได้	$\frac{0}{3}$	0 LD 50	$\frac{2}{3}$	9.50 LD 50	$\frac{1}{3}$	น้อยมากคำนวณไม่ได้
7	0.25 0.125	2 LD 50 2 LD 50	$\frac{1}{3}$ –	น้อยมากคำนวณไม่ได้	$\frac{0}{3}$ –	0 LD 50	$\frac{3}{3}$ $\frac{2}{3}$	18.96 LD 50	$\frac{0}{3}$	0 LD 50
8	0.25 0.125	2 LD 50 2 LD 50	$\frac{1}{3}$ –	น้อยมากคำนวณไม่ได้	$\frac{1}{3}$ –	น้อยมากคำนวณไม่ได้	$\frac{3}{3}$ $\frac{2}{3}$	18.96 LD 50	$\frac{1}{3}$	น้อยมากคำนวณไม่ได้
9	0.25 0.125	2 LD 50 2 LD 50	$\frac{1}{3}$ –	น้อยมากคำนวณไม่ได้	$\frac{1}{3}$ –	น้อยมากคำนวณไม่ได้	$\frac{3}{3}$ $\frac{2}{3}$	18.96 LD 50	$\frac{0}{3}$	0 LD 50

หมายเหตุ ๑. เริ่มเจาะเลือดครั้งที่ ๑ หลังจากให้ antigen dose ที่ ๒ เป็นเวลา ๗

๒. การเจาะเลือดแต่ละครั้งจะห่างระยะเวลาห่างกัน ๗-๑๐ วัน

เจาะเลือดครั้งที่	ปริมาณที่ฉีดหนู ๑ ตัว		แกะทดลองกลุ่มที่ ๑		แกะทดลองกลุ่มที่ ๒		แกะทดลองกลุ่มที่ ๓		แกะทดลองกลุ่มที่ ๔	
	ซีรั่มแกะ (มล.)	พิษงูเห่า	จำนวนหนูรอด / จำนวนหนูที่ฉีด	ซีรั่ม ๑ มล. ทำลายพิษงูได้	จำนวนหนูรอด / จำนวนหนูที่ฉีด	ซีรั่ม ๑ มล. ทำลายพิษงูได้	จำนวนหนูรอด / จำนวนหนูที่ฉีด	ซีรั่ม ๑ มล. ทำลายพิษงูได้	จำนวนหนูรอด / จำนวนหนูที่ฉีด	ซีรั่ม ๑ มล. ทำลายพิษงูได้
10	0.25	2 LD_{50}	$\frac{1}{3}$	น้อยมากคำนวณไม่ได้	$\frac{1}{3}$	น้อยมากคำนวณไม่ได้	$\frac{3}{3}$	18.96 LD_{50}	$\frac{0}{3}$	0 LD_{50}
	0.125	2 LD_{50}	-		-		$\frac{2}{3}$		-	
11	0.25	2 LD_{50}	$\frac{1}{3}$ *	น้อยมากคำนวณไม่ได้	$\frac{0}{3}$ *	0 LD_{50}	$\frac{3}{3}$	18.96 LD_{50}	$\frac{0}{3}$	0 LD_{50}
	0.125	2 LD_{50}	-		-		$\frac{2}{3}$		-	
12	0.25	2 LD_{50}	$\frac{1}{3}$	น้อยมากคำนวณไม่ได้	-	**	$\frac{3}{3}$		-	**
	0.125	2 LD_{50}	-		-	-	$\frac{2}{3}$	26.76 LD_{50}	-	-
	0.0625	2 LD_{50}	-		-	-	$\frac{1}{3}$		-	
13	0.25	2 LD_{50}	-	**	-	-	$\frac{3}{3}$	37.91 LD_{50}	-	-
	0.125	2 LD_{50}	-	-			$\frac{3}{3}$			
	0.0625	2 LD_{50}	-				$\frac{2}{3}$			
14	0.25	2 LD_{50}					$\frac{3}{3}$			
	0.125	2 LD_{50}	-	-	-	-	$\frac{3}{3}$	37.91 LD_{50}	-	-
	0.0625	2 LD_{50}					$\frac{2}{3}$			
15	0.25	2 LD_{50}					$\frac{3}{3}$			
	0.125	2 LD_{50}	-	-	-	-	$\frac{3}{3}$	37.91 LD_{50}	-	-
	0.0625	2 LD_{50}					$\frac{2}{3}$			

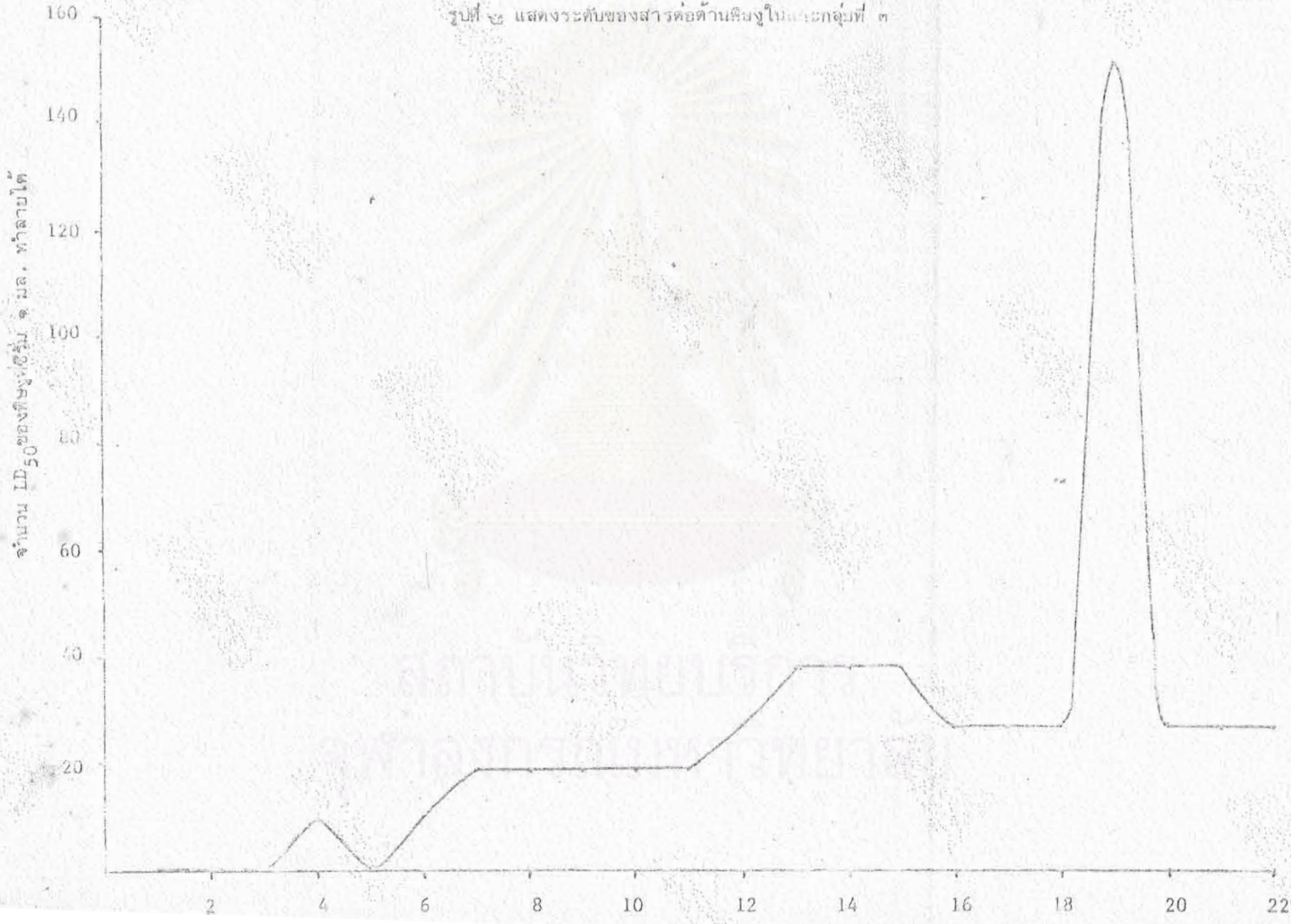
* งดฉีดแอนติเจ ...งแต่การทดลองนี้เป็นต้น

** ...ยุดการทดล... แต่ การทดลองนี้เป็น

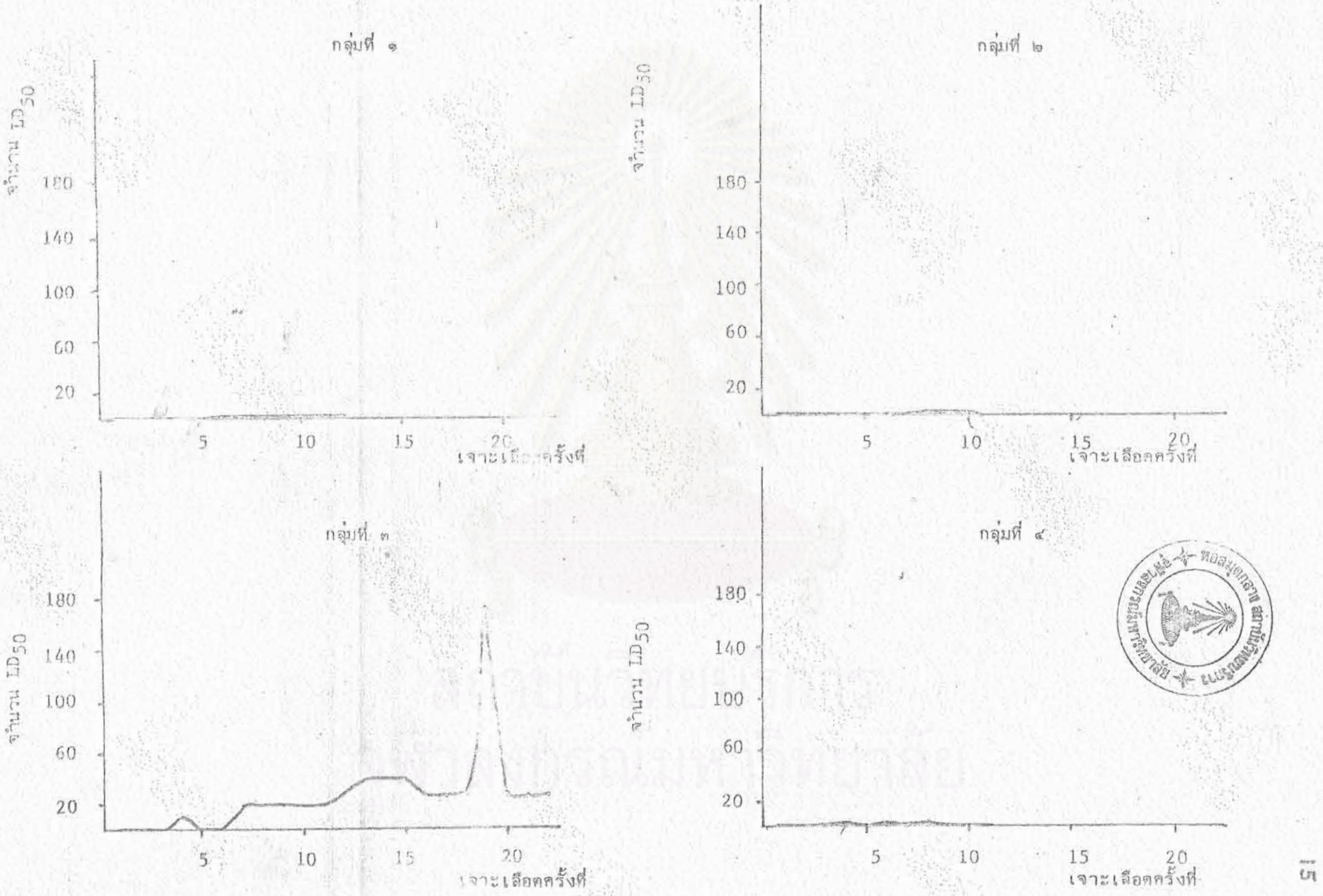
เจาะเลือดครั้งที่	ปริมาณที่ฉีดหนู ๑ ตัว		แกะทดลองกลุ่มที่ ๑		แกะทดลองกลุ่มที่ ๒		แกะทดลองกลุ่มที่ ๓		แกะทดลองกลุ่มที่ ๔	
	ซีรั่มแกะ (มล.)	พิษงูเห่า	จำนวนหนูรอด / จำนวนหนูที่ฉีด	ซีรั่ม ๑ มล. ทำลายพิษงูได้	จำนวนหนูรอด / จำนวนหนูที่ฉีด	ซีรั่ม ๑ มล. ทำลายพิษงูได้	จำนวนหนูรอด / จำนวนหนูที่ฉีด	ซีรั่ม ๑ มล. ทำลายพิษงูได้	จำนวนหนูรอด / จำนวนหนูที่ฉีด	ซีรั่ม ๑ มล. ทำลายพิษงูได้
16	0.25 0.125 0.0625	2 LD_{50} 2 LD_{50} 2 LD_{50}	-	-	-	-	$\frac{3}{3}$ $\frac{2}{3}$ $\frac{1}{3}$	26.76 LD_{50}	-	-
17	0.25 0.125 0.0625	2 LD_{50} 2 LD_{50} 2 LD_{50}	-	-	-	-	$\frac{3}{3}$ $\frac{2}{3}$ $\frac{1}{3}$	26.76 LD_{50}	-	-
18	0.25 0.125 0.0625	2 LD_{50} 2 LD_{50} 2 LD_{50}	-	-	-	-	$\frac{3}{3}$ $\frac{2}{3}$ $\frac{1}{3}$	26.76 LD_{50}	-	-
19	0.25 0.125 0.0625 0.03125 0.01562 0.00781	2 LD_{50} 2 LD_{50} 2 LD_{50} 2LD_{50} 5 2LD_{50} 25 2LD_{50}	-	-	-	-	$\frac{3}{3}$ $\frac{3}{3}$ $\frac{3}{3}$ $\frac{3}{3}$ $\frac{2}{3}$ $\frac{0}{3}$	150.64 LD_{50}	-	-
20	0.25 0.125 0.0625	2LD_{50} 2LD_{50} 2 LD_{50}	-	-	-	-	$\frac{3}{3}$ $\frac{2}{3}$ $\frac{1}{3}$	26.76 LD_{50}	-	-

เจาะเลือดครั้งที่	ปริมาณที่ฉีดหนู ๑ ตัว		แกะทดลองกลุ่มที่ ๑		แกะทดลองกลุ่มที่ ๒		แกะทดลองกลุ่มที่ ๓		แกะทดลองกลุ่มที่ ๔	
	ซีรั่มแกะ (มล.)	พิษงูเท่า	จำนวนหนูรอด / จำนวนหนูที่ฉีด	ซีรั่ม ๑ มล. ทำลายพิษงูได้	จำนวนหนูรอด / จำนวนหนูที่ฉีด	ซีรั่ม ๑ มล. ทำลายพิษงูได้	จำนวนหนูรอด / จำนวนหนูที่ฉีด	ซีรั่ม ๑ มล. ทำลายพิษงูได้	จำนวนหนูรอด / จำนวนหนูที่ฉีด	ซีรั่ม ๑ มล. ทำลายพิษงู
21	0.25 0.125 0.0625	2LD 50 2LD 50 2LD 50	-	-	-	-	$\frac{3}{3}$ $\frac{2}{3}$ $\frac{1}{3}$	26.76 LD_{50}	-	-
22	0.25 0.125 0.0625	2LD 50 2LD 50 2LD 50	-	-	-	-	$\frac{3}{3}$ $\frac{2}{3}$ $\frac{1}{3}$	26.76 LD_{50}	-	-

รูปที่ ๔ แสดงระดับของสารต่อต้านพิษงูในแต่ละกลุ่มที่ ๓



รูปที่ ๓ เปรียบเทียบระดับของสารต่อต้านทิวบูไลน์ในกลุ่มที่ ๑,๒,๓,๔ โดยใช้ค่า ID_{50} ที่ชั่งได้ ๑ มล. ทำลายได้



หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การอภิปรายผล

พิษงูเห่าไทย (Naja naja siamensis) ซึ่งเป็นพิษงูเห่าที่ใช้ในการทดลองนอกจากจะประกอบด้วยสารพิษที่เรียกว่า neurotoxin ซึ่งเป็นสารพิษที่เป็นสาเหตุของการตายแล้ว ยังประกอบไปด้วยสารอื่น ๆ อีกมากมาย การแยกสารพิษบริสุทธิ์(puretoxin) ออกจากพิษงูนั้นเท่าที่มีผู้ทำมาแล้วกับพิษงูชนิดต่าง ๆ มีหลายวิธี เช่นวิธี dialysis วิธีตกตะกอนด้วยสารเคมีชนิดต่าง ๆ หรือวิธีทำลายสารที่ไม่ต้องการโดยการตกตะกอนด้วยความร้อนเป็นต้น สำหรับพิษงูเห่าไทยผู้วิจัยได้แยกโปรตีนที่เป็นสารพิษออกโดยทำให้สารอื่นตกตะกอนด้วยความร้อนสูง 80 °ซ เป็นเวลา ๒๐ นาที ที่ pH 5.8 (เป็นวิธีที่ผู้วิจัยได้ทำวิจัยและส่งรายงานให้กับทุนสมเด็จพระมหิตลาธิเบศรแล้วแต่ยังไม่ได้ตีพิมพ์) วิธีการดังกล่าวเป็นเพียงการขจัดโปรตีนที่ไม่ใช่สารพิษออกไปส่วนหนึ่งเท่านั้น มิได้เป็นการทำให้ได้สารพิษบริสุทธิ์ ๑๐๐% การที่ผู้วิจัยเลือกวิธีนี้เพราะเป็นวิธีที่ทำได้ง่ายเหมาะกับการประยุกต์ใช้ทั่ว ๆไป แต่เป็นวิธีการที่ได้ผลพอควรคือสามารถขจัดโปรตีนที่ไม่ต้องการไปได้ถึง ๓๕% ของโปรตีนทั้งหมด และสารพิษที่ได้มีการสูญเสียความเป็นพิษไปเพียง ๑๖% เท่านั้น

ในการเตรียมโพลิเมอร์ของพิษงูตามที่ได้รายงานไว้ในข้อ ๒ หน้า ..๙. จะเห็นว่าการเติม glutaraldehyde ได้แบ่งออกเป็น ๒ ขั้นตอนคือ ในขั้นแรกใส่glutaraldehyde เข้าไปผสมกับสารละลายพิษงูโดยใช้ปริมาณ glutaraldehyde 40 % ของน้ำหนักโปรตีนที่อยู่ในสารละลายพิษงูนั้น ต่อจากนั้นก็แยกเอาตะกอนออกจากน้ำใสแล้วเติมสารglutaraldehyde (2.5 %) ลงไปในน้ำใสโดยใช้สารละลาย glutaraldehyde ๗ มล. ต่อน้ำใส ๑๐๐ มล. การที่ต้องแบ่งเติมเป็น ๒ ครั้ง เพราะผู้วิจัยพบว่าถ้าเติมไปครั้งเดียวทั้งหมดจะทำให้เกิดโพลิเมอร์ใหญ่เกินไปไม่เหมาะที่จะใช้เป็นแอนติเจน เพราะโมเลกุลของglutaraldehyde ที่เติมไปในระยะหลังจะไปจับโพลิเมอร์ขนาดเล็ก ๆ ที่เกิดขึ้นก่อนให้มารวมกันได้เป็นโพลิเมอร์ใหญ่ขึ้นแทนที่จะไปจับกับโมเลกุลของพิษงูที่ยังอยู่เป็นโมเลกุลเดี่ยว ๆ หรือ โพลิเมอร์ของ ๒-๓ โมเลกุล ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้แยกเอาโพลิเมอร์ที่เกิดขึ้นในตอนแรกออกก่อน แล้วจึงเติม glutaraldehyde ลงไปอีกเพื่อให้ไปจับกับโมเลกุลของพิษงูที่เหลือ วิธีนี้ผู้วิจัยพบว่าสามารถทำลายความเป็นพิษให้หมดไปได้และได้โพลิเมอร์ของพิษงูที่ไม่ใหญ่เกินไป

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยมุ่งที่จะศึกษาปฏิกริยาตอบโต้ทางอิมมูนในแกะที่มีต่อโพลิเมอร์ที่เตรียมขึ้น เพื่อที่จะได้ทราบข้อมูลว่า

ก. แกะเป็นสัตว์ที่เหมาะสมที่จะใช้ในการผลิตซีรั่มแก้พิษงูหรือไม่ คือสามารถสร้างสารต่อต้านพิษงูได้มากเพียงใดเมื่อได้รับการฉีดโพลิเมอร์ของพิษงู

ข. ต้องการทราบปริมาณของโพลิเมอร์ที่เหมาะสมที่จะทำให้แกะสร้างภูมิคุ้มกันได้สูงที่สุด

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าแกะเป็นสัตว์ที่สามารถสร้างสารต่อต้านพิษงูได้ดี เมื่อเราฉีดโพลิเมอร์ของพิษงูเข้าไปในปริมาณที่เหมาะสม

แกะกลุ่มที่ ๑ ได้รับการฉีดแอนติเจนหรือโพลิเมอร์ของพิษงูตัวละ มก. (๑ มก. ต่อ ๑ กก.) ในแกะกลุ่มนี้ได้เริ่มตรวจพบสารต่อต้านพิษงูหลังจากการฉีดแอนติเจนครั้งที่ ๗ แต่ระดับต่ำมากไม่สามารถคำนวณเป็นค่า LD_{50} ได้ ผู้วิจัยได้ฉีดแอนติเจนต่อไปอีก ๖ ครั้งแต่ระดับของสารต่อต้านพิษงูในเลือดของแกะกลุ่มนี้มิได้เพิ่มขึ้น ผู้วิจัยจึงหยุดการทดลองโดยเชื่อว่าปริมาณของแอนติเจนที่ให้กับแกะกลุ่มนี้ต่ำเกินไป คือต่ำกว่าปริมาณที่เหมาะสม (optimal dose)

ในแกะกลุ่มที่ ๒ ถึงแม้ว่าปริมาณของแอนติเจนที่ให้จะเพิ่มเป็น ๒ เท่าของที่ให้ในกลุ่มที่ ๑ ก็ตาม (๒ มก. ต่อ ๑ กก. ของแกะ) แต่ปริมาณของสารต่อต้านพิษที่สร้างขึ้นในตัวแกะก็ยังต่ำมาก และเริ่มตรวจพบหลังจากให้แอนติเจนไปถึง ๗ ครั้ง ระดับของสารต่อต้านพิษงูได้ลดลงหลังจากให้แอนติเจนครั้งที่ ๑๒ ผลการทดลองดังกล่าวย่อมอธิบายได้ว่า ปริมาณของแอนติเจนที่ให้ในแกะกลุ่มที่ ๒ ยังจัดว่าต่ำกว่าปริมาณที่เหมาะสม (optimal dose) ดังนั้นการสร้างสารต่อต้านพิษงูจึงไม่ดีไปกว่ากลุ่มที่ ๑ ความแตกต่างของระดับสารต่อต้านพิษในกลุ่มที่ ๑ และ ๒ มีความแตกต่างกันเล็กน้อย ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบระดับสารต่อต้านพิษงูในกลุ่มที่ ๓ แล้ว ผู้วิจัยเชื่อว่าความแตกต่างเล็กน้อยระหว่างระดับของสารต่อต้านพิษในกลุ่ม ๑ และ ๒ เกิดจากความแตกต่างทางลักษณะทางกรรมพันธุ์ของแกะเหล่านั้น (genetic variation)

แกะกลุ่มที่ ๓ ได้รับการฉีดแอนติเจน ๑๐๐ มก. ต่อแกะ ๑ ตัว (๔ มก. แกะ ๑ กก.) ผู้วิจัยเชื่อว่าปริมาณของแอนติเจนที่ให้กับแกะกลุ่มนี้เป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับแกะกลุ่มอื่น ๆ แกะกลุ่มนี้สามารถสร้างสารต่อต้านพิษงูได้เร็วกว่ากลุ่มอื่น ๆ คือ เริ่มตรวจพบสารต่อต้านพิษงูหลังจากฉีดแอนติเจนครั้งที่ ๓ ต่อจากนี้ระดับของสารต่อต้านพิษงูโดยเฉลี่ยแล้วจะค่อย ๆ สูงขึ้นถึงแม้ว่าบางหรั้งจะตกลงบ้างซึ่งผู้วิจัยเข้าใจว่าอาจเนื่องมาจากสภาพทางสรีระวิทยาของสัตว์ในระยะนั้น หรืออาจเนื่องจากการเจาะเลือดเพื่อตรวจหาระดับสารต่อต้านพิษงูในครั้งนั้น ๆ ช้าไปกว่ากำหนด ๒-๓ วัน เนื่องจากตรงกับวันหยุด แต่อย่างไรก็ตามหลังจากได้รับการฉีดแอนติเจนครั้งที่ ๒๐ ระดับของสารต่อต้านพิษในแกะกลุ่มนี้ได้พุ่งขึ้นสูงมาก คือ ซีรั่ม ๑ มล. สามารถทำลายพิษงูได้ถึง 150.64 LD 50 ในการวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ตรวจดูระดับของสารต่อต้านพิษงูในซีรั่มของแกะแต่ละตัวในกลุ่มนี้ด้วย ผลพบว่าซีรั่มของแกะแต่ละตัวมีระดับสารต่อต้านพิษงูสูงเท่า ๆ กัน เนื่องจากระดับของสารต่อต้านพิษงูที่ได้ครั้งนี้สูงมาก ผู้วิจัยจึงได้หยุดการฉีดแอนติเจน เนื่องจากเกรงว่าจะเป็นการให้มากเกินไปอีกทั้งผู้วิจัยต้องการจะทดสอบว่าแกะกลุ่มนี้จะสามารถรักษาระดับของสารต่อต้านพิษงูได้นานเท่าใด แต่ผลปรากฏว่า ๒ อาทิตย์ต่อมา ระดับของสารต่อต้านพิษตกลงมามาก คือเหลือเพียง 26.76 LD 50 ต่อ ๑ มล. ผู้วิจัยได้ติดตามระดับของสารต่อต้านพิษงูในซีรั่มของแกะนี้ต่อไปอีก ๒ เดือนพบว่าระดับคงที่เรื่อยไปคืออยู่ในระดับ 26.76 LD 50 ต่อ ๑ มล.

แกะกลุ่มที่ ๔ แกะกลุ่มนี้ได้รับการฉีดแอนติเจน ๑๕๐ มก. ต่อแกะ ๑ ตัว (๖ มล. ต่อ ๑ กก.) ได้เริ่มตรวจพบระดับของสารต่อต้านพิษงูในซีรั่ม หลังจากการฉีดแอนติเจนครั้งที่ ๕ แต่อยู่ในระดับต่ำมากจนคำนวนหาค่า LD 50 ไม่ได้ ต่อจากนั้นระดับสารต่อต้านพิษงูไม่เพิ่มขึ้นเลยจึงได้ยุติการทดลองหลังจากการฉีดแอนติเจนครั้งที่ ๑๓ เหตุที่แกะในกลุ่มนี้สร้างสารต่อต้านพิษงูได้ในปริมาณที่ต่ำมากนั้น ผู้วิจัยคาดว่าเป็นเพราะปริมาณของแอนติเจนที่ให้นั้นมากเกินไป จึงทำให้เกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า "immunological paralysis" ขึ้น

ผลการวิจัยในแกะทั้ง ๔ กลุ่ม สรุปได้ว่า โพลิเมอร์ของพิษงูเห่าที่เตรียมขึ้นสามารถกระตุ้นให้แกะสร้างสารต่อต้านพิษงูเห่าได้ ถ้าให้ปริมาณที่เหมาะสม ปริมาณที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการวิจัยนี้ คือ ๔ มก. ต่อน้ำหนักแกะ ๑ กก. ด้วยปริมาณดังกล่าวแกะสามารถสร้างสารต่อต้านพิษงูได้ถึง 150.64 LD_{50} ในซีรั่ม ๑ มล. หลังจากฉีดโพลิเมอร์ไป ๒๐ ครั้ง ระดับของสารต่อต้านพิษงูในซีรั่มของแกะกลุ่ม ๓ ที่ได้สูงกว่าระดับสารต่อต้านพิษงูในซีรั่มของม้าที่สถานเสาวภาผลิตครั้งนี้ประมาณ ๓ เท่า

ข้อสรุป

โพลิเมอร์ของพิษงูเห่าไทย (Naja naja siamensis) ซึ่งได้จากการเชื่อมโยงโมเลกุลของพิษงูเห่าด้วย glutaraldehyde เป็นสารที่ไม่มีพิษเลืออยู่ แต่สามารถกระตุ้นให้แกะสร้างสารต่อต้านพิษงูเห่าได้ ระดับของสารต่อต้านพิษงูเห่าในซีรั่มของแกะนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณของโพลิเมอร์หรือแอนติเจนที่ฉีดเข้าไป ในการวิจัยนี้ได้ฉีดโพลิเมอร์ให้แกะโดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังในปริมาณต่าง ๆ กัน คือ กลุ่มที่ ๑ ๑ มก. , กลุ่มที่ ๒ ๒ มก. กลุ่มที่ ๓ ๔ มก. และกลุ่มที่ ๔ ๖ มก. ต่อน้ำหนักแกะ ๑ กก. และพบว่าแกะกลุ่มที่ ๓ ที่ได้รับโพลิเมอร์ ๔ มก. ต่อน้ำหนัก ๑ กก. สามารถสร้างสารต่อต้านพิษงูได้สูงที่สุดคือได้สูงถึง 150.64 LD_{50} ต่อซีรั่ม ๑ มล. หลังจากได้รับการฉีดโพลิเมอร์ ๒๐ ครั้ง ถ้าฉีดโพลิเมอร์สูงเกินไป คือในกลุ่มที่ ๔ และต่ำเกินไป คือในกลุ่มที่ ๑ และ ๒ ระดับของสารต่อต้านพิษที่สร้างจะต่ำมาก หรือตรวจไม่พบเลย

ข้อเสนอแนะ

การวิจัยที่ได้รายงานมานี้แสดงให้เห็นว่าเราสามารถผลิตสารต่อต้านพิษงูที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นกว่าที่มีใช้อยู่ปัจจุบันได้โดยการฉีดโพลิเมอร์ของพิษงูเข้าในแกะในปริมาณที่เหมาะสมการทดลองต่อไปที่น่าจะทำต่อไปคือ

ก. การวิจัยในแกะโดยใช้ปริมาณโพลิเมอร์เท่ากับกลุ่มที่ ๓ แต่หลังจากระดับของสารต่อต้านพิษงูพุ่งขึ้นแล้ว (ตามกลุ่ม ๓ ได้ 150.64 LD_{50}) น่าจะพยายามให้โพลิเมอร์ของพิษงูต่อไปในปริมาณต่ำลง เพื่อกระตุ้นให้ระดับสารต่อต้านพิษงูสูงขึ้นอีก และพยายามหาวิธีทำให้แกะสามารถรักษาระดับสารต่อต้านพิษงูให้ได้นาน

ข. วิจัยในสัตว์ใหญ่ขึ้น เช่น ม้า เป็นต้น เพื่อให้ได้ปริมาณสารต่อต้านพิษงูที่จะมาใช้รักษาคนปริมาณมาก

เอกสารอ้างอิง

กาญจนา ศีระสมบูรณ์ "การทำลายพิษงูเห่าโดยการทำให้อยู่ในรูปของโพลิเมอร์ และคุณสมบัติของการเป็นแอนติเจนของโพลิเมอร์ในหนู" วิทยานิพนธ์สำหรับปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. ๒๕๒๑

Avrameas, S. "Coupling of Enzymes to Proteins with Glutaraldehyde. Use of the Conjugates for the Detection of Antigens and Antibodies." Immunochemistry 6 (1969) : 43 - 52.

Avrameas, S., and Ternynck, T. "The Cross - linking of Proteins with Glutaraldehyde and Its Use for the Preparation of Immunoadsorbents."Immunochemistry 6 (1969) :53-66.

Chang,C.C., et al. "Studies on the Status of Tyrosyl Residues in Cobrotoxin."Biochem.Biphys. Acta 236(1971):164-166.

Huang, J.S., et al. "Photooxidation of Cobrotoxin." J.Formosan Med.Ass. 71 (1972) : 383 through Yang,C.C."Chemistry and Evolution of Toxins in Snake Venoms."Toxicon 12 (1974) : 1-42.

Karlsson, E., and Eaker, D. "Isolation of the Principal Neurotoxins of Naja naja Subspecies from the Asian Mainland. "Toxicon 10 (1972) : 217 - 221.

Lowry, O.H., et al. "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent." J. Biol. Chem. 193 (1951) : 265

Reed, L.J. and Muench, H.H Am. J. Hyg. 27 (1938) : 493 through Davis, B.D., et al. Microbiology. P. 649 - 650 Harper International Edition. New York, Evanston, and London: Harper & Row Publisher, 1967.

Yang, C.C. " Crystallization and Properties of Cobrotoxin from Formosan Cobra Venom." J. Biol. Chem. 240 (1965) : 1616 - 1618

Yang, C.C. " Chemistry and Evolution of Toxins in Snake Venoms." Toxicon 12 (1974) : 1 - 42.

Yang, C.C., Chang, C.C., and Wei, H.C. "Studies on Fluorescent Cobrotoxin." Biochem. Biophys. Acta 147 (1967) : 600-602

Yang, C.C., Chang, C.C., and Liu, I.F. "Studies on the Status of Arginine Residues in Cobrotoxin." 9th. Int. Congr. Biochem., Stockholm Colloguium D. Abs. (1973) : 455 through Yang,C.C. " Chemistry and Evolution of Toxins in Snake Venoms. "Toxicon 12 (1974) : 1 - 42.